

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Kimia Medik, Ilmu Mikrobiologi, dan Ilmu Farmakologi.

3.2 Ruang lingkup waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2016.

3.3 Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang

2. Waktu penelitian

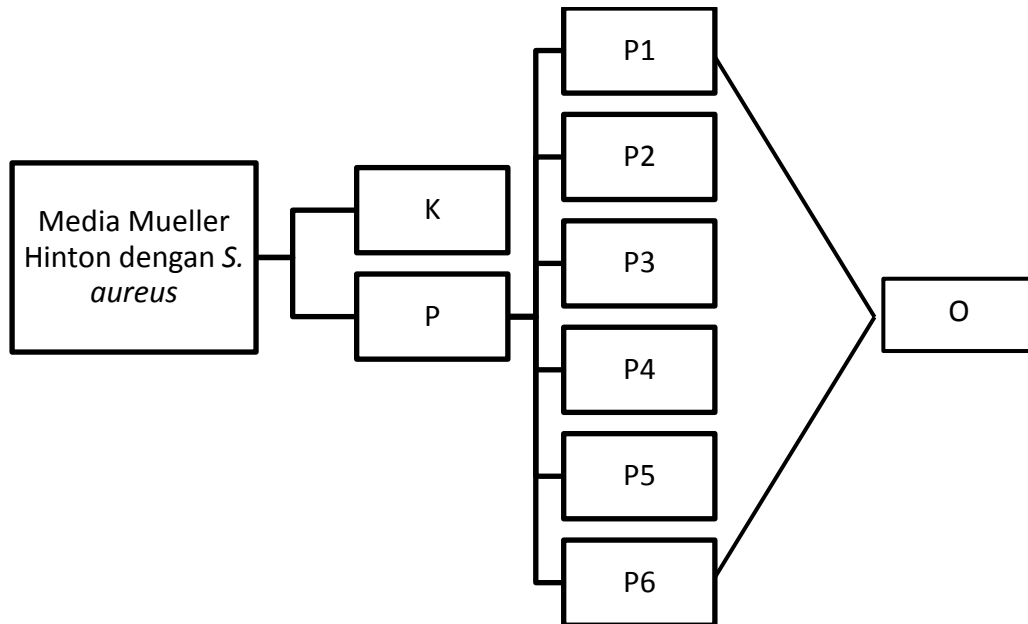
Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2016

3.4 Jenis dan rancangan penelitian

3.4.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan *post test only controlled group design*.

3.4.2 Rancangan penelitian



Gambar 3. Rancangan penelitian

Keterangan:

K: Kelompok kontrol. Sampel diberi disk antibiotik

P: Kelompok perlakuan. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh

P1: Kelompok perlakuan 1. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 5%

P1: Kelompok perlakuan 1. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 5%

P2: Kelompok perlakuan 2. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 20%

P3: Kelompok perlakuan 3. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 35%

P4: Kelompok perlakuan 4. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 50%

P5: Kelompok perlakuan 5. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 65%

P6: Kelompok perlakuan 6. Sampel diberi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi sebesar 80%

O: Diukur diameter hambat

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh *Averrhoa bilimbi*

Skala: rasio

3.5.2 Variabel terikat

Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Skala: rasio

3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
1.	Ekstrak daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> .)	Ekstrak daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> .) merupakan suatu hasil ekstraksi daun belimbing wuluh(<i>Averrhoa bilimbi</i>) , kemudian dibuat konsentrasi 80%, 65%, 50%, 35%, 20%, 5%. dalam aquades.	% (persen)	rasio
2.	Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	Pertumbuhan bakteri ditentukan dengan hasil pengukuran besar diameter zona hambat menggunakan jangka sorong	mm	rasio

3.7 Populasi dan sampel

3.7.1 Populasi target

Biakan bakteri *S.aureus*.

3.7.2 Populasi terjangkau

Biakan bakteri *S. aureus* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.

3.7.3 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah biakan bakteri *S.aureus* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.

3.7.3.1 Kriteria inklusi

Koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media Mueller Hinton (MH) setelah dipaparkan dengan perlakuan dan diinkubasi pada lingkungan aerob pada suhu 35° C selama 18-24 jam.

3.7.3.2 Kriteria eksklusi

Koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media MH dengan disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

3.7.4 Cara sampling

Cara sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah non-probability sampling jenis *consecutive sampling*.

3.7.5 Besar sampel

Berdasarkan hasil perhitungan dengan *consecutive sampling*, replikasi yang harus dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 4 kali. Sedangkan banyak perlakuan yang dilakukan berdasarkan konsentrasi ekstrak dan kelompok kontrol sebanyak 9. Banyak sampel pada penelitian ini adalah sebanyak 28.

3.8 Cara pengumpulan data

3.8.1 Bahan

- 1) Ekstrak daun belimbing wuluh
- 2) Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*
- 3) Bahan Media Mueller Hinton (MH):
 - Ekstrak daging 2gr/L
 - *Acid Hydrolase of Casein* 17,5 gr/L
 - Pati 1,5 gr/L
 - Agar 17 gr/L
- 4) Aquades

3.8.2 Alat

- 1) Labu Erlenmeyer
- 2) Cawan petri
- 3) Timbangan
- 4) Gelas ukur
- 5) Pipet ukur
- 6) Osse
- 7) Lampu Bunsen
- 8) *Autoclave*
- 9) Inkubator dengan suhu 35°
- 10) *Hole punching apparatus*

3.8.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan berdasarkan uji eksperimental yang dilakukan oleh peneliti di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Diponegoro Semarang merupakan data primer berupa hasil pertumbuhan koloni *S.aureus* pada media dan kelompok kontrol.

3.8.4 Persiapan alat, bahan dan media

Semua alat, bahan, dan media yang digunakan pada penelitian disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi, dengan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit, yang kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 2 jam.

3.8.5 Cara kerja

3.8.5.1 Pembuatan ekstrak daun *Averrhoa bilimbi*

- 1) Mengambil daun belimbing wuluh kemudian dipotong
- 2) Maserasi daun belimbing wuluh dengan etanol 60%-70% dengan shaker
- 3) Menyaring daun belimbing wuluh
- 4) Memisahkan antara fase air dan fase ekstrak daun belimbing wuluh
- 5) Menguapkan pelarut ekstrak tersebut dalam suhu 30°-40°C selama 1-2 hari
- 6) Membuat ekstrak dalam konsentrasi berbeda dengan cara melarutkan dalam ethanol 60%-70% dalam 1 ml campuran ekstrak:
 - Konsentrasi ekstrak 5%: 0,05 ml ekstrak + 0,95 ml aquades 60%-70%
 - Konsentrasi ekstrak 20%: 0,2 ml ekstrak + 0,8 ml aquades 60%-70%
 - Konsentrasi ekstrak 35%: 0,35 ml ekstrak + 0,65 ml aquades 60%-70%
 - Konsentrasi ekstrak 50%: 0,5 ml ekstrak + 0,5 ml aquades 60%-70%
 - Konsentrasi ekstrak 65%: 0,65 ml ekstrak + 0,35 ml aquades 60%-70%

- Konsentrasi ekstrak 80%: 0,8 ml ekstrak + 0,2 ml aquades
60%-70%

3.8.5.2 Pembuatan suspensi bakteri

1. Mengambil bakteri *S. aureus*
2. Suspensikan bakteri tersebut dalam larutan NaCl 0,9% sampai didapatkan kekeruhan standar Mc Farland 0,5

3.8.5.3 Pembuatan media Mueller Hinton

1. Melarutkan 38 gr bahan media dalam 1 L air
2. Memanaskannya hingga mendidih sampai media larut
3. Meletakkan pada *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruangan
4. Menuangkan bahan media yang sudah didinginkan ke cawan petri steril pada bidang horizontal agar kedalamannya seragam
5. Membiarkan media yang sudah diletakkan di cawan petri steril pada suhu ruangan
6. Memastikan pH akhir media yaitu pada $7,3 \pm$ pada suhu 25°C

3.8.5.4 Uji Kadar Hambat Minimum

Metode agar *well-diffusion*:

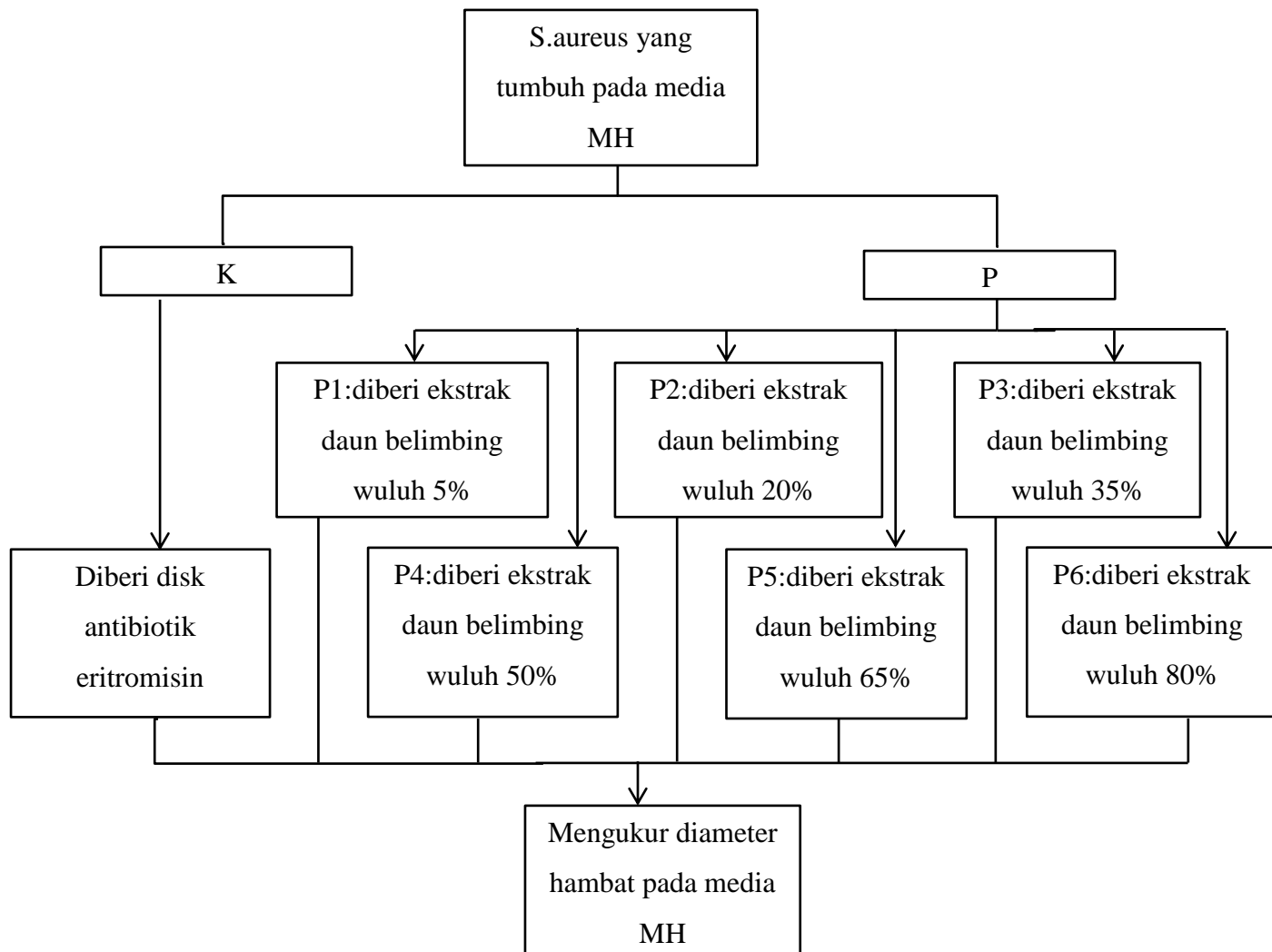
- 1) Menyiapkan media Mueller Hinton steril
- 2) Mengambil suspensi *S. Aureus* dengan lidi kapas steril
- 3) Meratakan suspensi pada media

- 4) Membuat sumur pada media menggunakan *agar hole puching apparatus* sebanyak 9 sumur
- 5) Meneteskan ekstrak pada sumur
- 6) Menginkubasi pada lingkungan aerob dengan suhu 35°C selama 18-24 jam
- 7) Menghitung diameter hambat pada media dengan jangka sorong

Metode *disc-diffusion*:

- 1) Menyiapkan media Mueller Hinton steril
- 2) Mengambil suspensi *S.aureus* dengan lidi kapas steril
- 3) Meratakan suspensi pada media
- 4) Meletakkan disk ekstrak pada permukaan media
- 5) Menginkubasi pada lingkungan aerob dengan suhu 35°C selama 18-24 jam
- 6) Menghitung diameter hambat media dengan menggunakan jangka sorong

3.8.5.5 Alur penelitian



Gambar 4. Alur penelitian

3.9 Analisis data

Data yang diperoleh dalam penelitian akan dilakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel pada penelitian ini kurang dari 50. Apabila data tersebut berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik one way Anova untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, kemudian dilanjutkan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui pada

kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna. Apabila data tidak berdistribusi normal, dan mempunyai varians yang berbeda dilakukan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. H_0 ditolak apabila nilai derajat kemaknaan adalah $p < 0,05$, pada interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika penelitian

Etika penelitian diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK). Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang setelah disetujuinya proposal penelitian serta ijin penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro.

